

Thesis

TÜBINGEN

1967

Aus der Kinderklinik der Universität Tübingen

Ehem. Direktor: Professor Dr. K. Betke

Vergleichende Untersuchungen
über das elektrophoretische Verhalten
der Erythrozytenkatalase von Mensch und Tier

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Friedrich Kötze
aus Daaden

1967

9203

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität Tübingen

Ehem. Direktor: Professor Dr. K. Betke

Vergleichende Untersuchungen
über das elektrophoretische Verhalten
der Erythrozytenkatalase von Mensch und Tier

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Friedrich Kötz
aus Daaden

1967

Dekan: Professor Dr. F. Lembeck

Berichterstatte: Professor Dr. K. Betke

Meinen Eltern
in Dankbarkeit

INHALT

	Seite
A. EINLEITUNG	1
1. Historisches	1
2. Funktion der Katalase	2
3. Nachweisverfahren	2
B. METHODE	4
1. Herstellung des Hämolsates	4
2. Bereitung des Gels	4
3. Elektrophorese	4
4. Färbung	5
5. Deutung des Prinzips der Methode	5
C. ERGEBNISSE	7
1. Untersuchungen zur Methode	7
2. Alterung in vitro	9
3. Alterung in vivo	10
4. Hitzedenaturierung	11
5. Katalase bei verschiedenen Hämoglobinen	11
6. Anormale Katalase	13
7. Katalase bei Tieren	14
8. Quantitative Katalasebestimmung	19

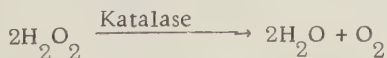
	Seite
D. DISKUSSION	20
E. ZUSAMMENFASSUNG	23
F. LITERATUR	24

Lebenslauf

A. EINLEITUNG

1. Historisches

Zu Beginn des 19. Jahrhunderts beobachtete THENARD (44), der Entdecker des Wasserstoffsuperoxyds, daß Fibrin und viele tierische und pflanzliche Gewebe Wasserstoffsuperoxyd in Wasser und molekularen Sauerstoff zerlegen können. Im Verlauf von Untersuchungen über Oxydationsprozesse entdeckte SCHÖNBEIN (35) das erste Oxydationsenzym, die Katalase. Diesen Namen erhielt das Ferment aber erst 1901 von LOEW (29, 30), der mit RAUDNITZ (34) nachwies, daß diese Fähigkeit, Wasserstoffsuperoxyd zu spalten, nicht eine Eigenschaft der Lebensvorgänge selbst war, wie man bis dahin annahm, sondern daß man dieses Ferment aus den Zellen extrahieren kann. 1930 klärten ZEILE (52) und HELLSTRÖM (51) die Struktur auf und STERN (38) zeigte, daß die prosthetische Gruppe aus Protohäm, das heißt vier Hämingruppen pro Molekül, besteht. Bald darauf gelang SUMNER und DOUNCE (41) die Kristallisation der Rinderleberkatalase, der die Reindarstellung von Katalasen aus den verschiedensten tierischen und pflanzlichen Geweben folgte (15, 21). Das Molekulargewicht (4, 23, 28, 33) liegt zwischen 220 000 und 250 000, der Eisengehalt bei 0,09 % (23, 28). Mit den chemischen Eigenschaften und der Reaktionskinetik befaßte sich Ende der vierziger Jahre insbesondere die Arbeitsgruppe um THEORELL (45) in Stockholm (B.CHANCE, AGNER, BONNICHSEN, AKESON), der die Katalase mit der ihr sehr ähnlichen Peroxydase zu der Gruppe der Hydroperoxydasen zusammenfaßte. Während die Peroxydasen den Sauerstoff von gespaltenem Wasserstoffperoxyd auf verschiedene Akzeptoren übertragen, dient als solcher bei der Katalase ein zweites Molekül Wasserstoffperoxyd, so daß im Endeffekt zwei Moleküle Wasserstoffperoxyd in zwei Moleküle Wasser und ein Molekül Sauerstoff zerlegt werden:



Für die Katalase ist aber sehr wesentlich ihre Fähigkeit auch als Peroxydase zu wirken, wobei sie den Sauerstoff allerdings ausschließlich auf primäre und sekundäre Alkohole überträgt.

2. Funktion der Katalase

An diesen doppelten Eigenschaften der Katalase entzündete sich auch der Streit darüber, was die eigentliche Funktion dieses Fermentes im physiologischen Bereich sei. Ursprünglich nahm man eine spezifische Schutzwirkung für Hämoglobin und Glutathion gegen toxische Schädigungen durch Hydroperoxyde an, die nach WIELAND bei den biologischen Oxydationsabläufen entstehen (LOEW (29, 30), BINGOLD (11), LEMBERG und FOULKES (27)). In eine ähnliche Richtung weisen auch die Fälle von Akatalasie, einem autosomal-rezessiven Erbleiden in Japan (42, 43), bei denen wahrscheinlich auf Grund des Fehlens der Katalase das von der Mundflora gebildete Wasserstoffsuperoxyd nicht abgebaut wird und so zu Gangränen der Mundschleimhaut führt.

Ausgehend von ihren experimentellen Beobachtungen kommen KEILIN und HARTREE (24) sowie CHANCE und THEORELL (45) zu der Auffassung, daß unter anderem auf Grund der geringen Konzentration von Wasserstoffperoxyd die peroxydatische Wirkung überwiegt, so daß hier der eigentümliche Fall vorliegt, "daß bei einem Enzym die am leichtesten zu beobachtende Wirkung, die zudem in hoher Geschwindigkeit abläuft, unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich gar keine Rolle spielt" (28). Auch von klinischer Seite her bemühte man sich, etwas über die Funktion der Katalase zu erfahren, nachdem VAN THIENEN (46) festgestellt hatte, daß bei perniziöser Anämie der Katalasegehalt der Erythrozyten erhöht war. In Verbindung mit Untersuchungen über die Heinzkörperbildung bei hämolytischen Anämien deuteten KÜNZER, SCHÜTZ und AMBS (26) die deutliche Herabsetzung der Katalase-Aktivität in den Erythrozyten von Neugeborenen und Säuglingen als eine Ursache der Heinzkörperbildung im Sinne eines unzulänglichen Schutzes gegenüber oxydativen Schädigungen. GRÖSCHNER (20) lehnt diese Ansicht im Hinblick auf die Vorstellungen von THEORELL ab. Neuerdings belebte die Entdeckung von atypischen Katalasen (THORUP, STROLE, LEAVELL (48) sowie BAUR (5)) erneut die Diskussion über die Bedeutung der Katalase. Interessant ist weiterhin die Beobachtung, daß bei Eisenmangelanämie der Katalasegehalt der roten Blutkörperchen relativ viel weniger sinkt als deren Hämoglobingehalt (9).

3. Nachweisverfahren

Schon früh hat man versucht, den Katalasegehalt eines Gewebes oder einer Flüssigkeit zu bestimmen. Anfangs bediente man sich der Beobachtung der Schaumentwicklung bei Zugabe von Hydroperoxyd. Darauf beruht auch ein Screening-

Test, der zur Erfassung von Akatalasien in einem großen Untersuchungsgut verwandt wurde (1, 2). Bald aber schon benutzte man sogenannte Katalaseröhrchen, besonders in der Milchwirtschaft, in denen die Sauerstoff-Freisetzung gemessen werden konnte. Daraus entwickelten sich dann verschiedene gasometrische bzw. manometrische Verfahren, so z.B. das Verfahren von JUSATZ (22). Nebenher wurden aber auch titrimetrische Verfahren angegeben, die die Menge des nach Katalase-Einwirkung übrigbleibenden Wasserstoffperoxyd mit Hilfe von Kaliumpermanganat bestimmen (v. EULER und JOSEPHSON) (17). FEINSTEIN (18) benutzt wegen des langsameren und genauer meßbaren Reaktionsablaufs anstelle von Hydroperoxyd als Substrat Natriumperborat. Eine Methode von MARTI (31) ist eine Mikro-Modifikation des Verfahrens von FEINSTEIN. Eine moderne und heute häufig angewandte Methode ist die photometrische Bestimmung der Katalase-Aktivität nach GOLDBLITH und PROCTOR (19), die auf dem gleichen Prinzip wie das Verfahren von v. EULER und JOSEPHSON beruht. Einfach sind die Methoden von CHANCE (14), BERGMAYER (8) und BEERS und SIZER (7), die im Ultraviolett die Abnahme der Extinktion einer Wasserstoffperoxydlösung nach Katalasezugabe bestimmen. Weitere Verfahren sind noch die polarografische Bestimmung des restlichen Wasserstoffperoxyd nach KÜNZER, SCHÜTZ und AMBS (26) und die von BONNICHSEN, CHANCE und THEORELL (13) entwickelte oszillografische Polarografie, die vorwiegend reaktionskinetischen Untersuchungen dient.

Zur Katalase-Identifikation sind die Stärkeblockelektrophorese nach BLUM-BERG und MARTI (12) und die Dünnschichtelektrophorese nach BAUR (6) in Gebrauch, ebenso säulenchromatografische Verfahren mit Sephadex G 100 (AEBI et al.) (3) und DEAE-Cellulose (THORUP, CARPENTER und HOWARD) (49). Ausgehend von der von SMITHIES (37) und seinen Mitarbeitern für die Haptoglobine angegebenen Stärke-Gel-Elektrophorese entwickelten THORUP, STROLE und LEAVELL (47) eine Methode zur Identifikation von Erythrozytenkatalase. Der Nachteil dieser Methode war aber, daß man die Katalase mit der Jod-Stärke-Reaktion anfärbte und über ihr Verhältnis zu anderen Proteiden nur durch Vergleich mit der andersartig gefärbten zweiten Gelscheibe etwas aussagen konnte. TUDHOPE (50) gab dann eine Färbung mit o-Dianisidin und "Teepol" an, die auf der von OWEN, SILBERMAN und GOT (32) ausgearbeiteten Hämoglobinfärbung mit o-Dianisidin aufbaut und die das Hämoglobin und die NHP (non-hämoglobin-protein) braun-rot und die Katalase grün erscheinen läßt. Aber auch diese Methode erscheint noch umständlicher und keineswegs genauer als die von KLEIHAUER und BRANDT (25) angegebene, die nur eine Dianisidinfärbung benötigt. Da sie die in dieser Arbeit benutzte Methode ist, werden Einzelheiten weiter unten aufgeführt.

B. METHODE

1. Herstellung des Hämolysates

Durch Natriumcitrat ungerinnbar gemachtes Blut wird dreimal in 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen, zwischendurch jeweils 5 min bei 3000 Umdrehungen/Minute (Upm) zentrifugiert, worauf der klare Überstand abpipettiert und verworfen wird. Der Erythrozytenbrei wird mit etwa dem gleichen Volumen destillierten Wassers hämolysiert und mit Tetrachlorkohlenstoff ausgeschüttet. Nach 10minütigem Zentrifugieren bei 6000 Upm wird von dem überstehenden Hämolysat nach der Hämoglobin-Bestimmungs-Methode nach BETKE und SAVELSBERG (10) der Hämoglobingehalt bestimmt und die gewünschte Konzentration zwischen 1 und 5 g% - meist 2 g% - mit destilliertem Wasser eingestellt.

2. Bereitung des Gels

20 g Kartoffelstärke und 48 g hydrolysierte Stärke werden zusammen mit 90 ml Tris EDTA-Borat-Puffer, pH 9,0 (6,05 g Tris, 0,78 g EDTA, 0,46 g Borsäure auf 1000 ml Aquadest), gemischt und unter ständigem Umrühren in 360 ml des gleichen Puffers gegeben, die in einem Erlenmeyerkolben mit Absaugstutzen im kochenden Wasserbad erhitzt werden. Wenn das Gel glasig wird, werden 1,0 ml einer 5 %igen Hämoglobininlösung zugesetzt. Nun wird mit einer Wasserstrahlpumpe der Erlenmeyerkolben evakuiert, bis keine Luftblasen dem Gel mehr entweichen, weil diese die Elektrophorese stören würden. Das Gel wird in die dafür vorgesehene Form gegeben und kann nach seiner Abkühlung im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die besten Resultate erzielt man, wenn es etwa einen Tag dort gestanden hat.

3. Elektrophorese

Die Gel-Form ist so eingerichtet, daß man drei flache Scheiben mit einer

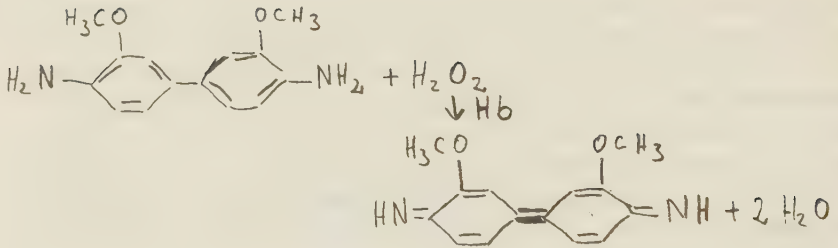
Drahtsaite abtrennen kann. Die oberste wird vor der Elektrophorese abgeschnitten und verworfen. Zum Einbringen des Hämolysates in das Gel werden als Träger 12 x 6 mm große Streifen von Whatman-3MM-Papier benutzt, die zuvor in das Hämolysat eingetaucht, gut zwischen Filterpapier abgetupft und dann senkrecht von oben in das Gel hineingesteckt werden. Als Brückenpuffer in der Elektrophorese dient Veronal-Veronal-Natrium-Puffer, pH 8,6, Ionenstärke 0,075. Nachdem die Brücken aufgelegt sind, wird das Gel zum Schutz gegen Austrocknen mit flüssigem Paraffin (Schmelzpunkt 42-44° C) beschichtet. Die Laufzeit beträgt bei 12° C, 400-600 V und etwa 60 mA ungefähr 4 Stunden.

4. Färbung

Nach der Elektrophorese wird das Gel mit der Drahtsaite in zwei Scheiben geschnitten; diese werden mit der Färbelösung zusammen in einer Glasschale inkubiert. Die Färbelösung besteht aus 100 mg o-Dianisidin, 200 ml 96 %igem Alkohol und 100 ml McIlvaine-Puffer, pH 4,7 (Zusammensetzung: 50 ml Stammlösung A und 50 ml Stammlösung B; Stammlösung A: 21,01 g Zitronensäure auf 1000 ml Aquadest; Stammlösung B: 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ auf 1000 ml Aquadest). Kurz vor der Färbung werden noch 0,5 ml 30 %iges Wasserstoffsuperoxyd (Perhydrol) hinzugesetzt. Eine Färbung dauert etwa 15 - 20 min; das heißt bis das Gel leicht braun und das Hämoglobin satt rotbraun gefärbt sind und an der Stelle der Katalase die helle ursprüngliche Farbe des Gels sich deutlich abhebt. Fotografiert wurden die Ergebnisse entweder sofort oder im Verlauf weniger Stunden. Sollte ein Gel einmal aufbewahrt werden, wurde es in eine hochprozentige Alkohollösung gelegt.

5. Deutung des Prinzips der Methode

Farbloses o-Dianisidin wird als Wasserstoffdonator von H_2O_2 in Anwesenheit von Hämoglobin, das hier als Peroxydase wirkt, oxydiert; dabei wird es rotbraun (TUDHOPE) (50), sehr dunkel an den Hb-Banden, schwach in der Gesamtfläche des Gels, das wie oben erwähnt, etwas Hämoglobin enthält



Dies ist der Vorgang der normalerweise auf der Oberfläche des Gels abläuft. Dort wo die Katalase sitzt, kommt es zur katalatischen Spaltung und nicht zur peroxydatischen Verarbeitung von Wasserstoffperoxyd und somit auch nicht zur Oxydation von o-Dianisidin. Daher bleibt diese Stelle hell. So werden auf einem Gel und mit einer einfachen Färbung Hämoglobine und Katalasen gleichzeitig sichtbar gemacht.

C. ERGEBNISSE

1. Untersuchungen zur Methode

Vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen, die Gegenstand dieser Arbeit sein sollen, wurden noch einige Versuche zur optimalen Ausführung der Methode von KLEIHAUER und BRANDT gemacht. Bei der Erprobung einiger Puffer - neben den angegebenen noch Phosphat-Puffer SØRENSEN, Borax-Phosphat-Puffer KOLTHOFF, Tris-EDTA-HCl-Puffer und Tris-Citrat-Puffer CHERNOFF und PETTIT - in verschiedenen Ionenstärken und pH-Bereichen und in mancherlei Kombination als Gel- und Brückenpuffer stellte sich heraus, daß die angegebenen Puffer für die entsprechenden Zwecke gut geeignet waren; nur ergab die Verdoppelung der Ionenstärke des Tris-EDTA-Borat-Gelpuffers erheblich schärfere Banden.

Neben den Bedingungen für das Gel wurden auch die für die Färbung untersucht. Es wurden deswegen in drei Reihen die Konzentration von Hämoglobin im Gel, o-Dianisidin oder Wasserstoffperoxyd variiert; und zwar jeweils in fünf verschiedenen Konzentrationen, d.h. eine höhere, die angegebene und drei niedrigere. Dabei zeigte sich, daß die Konzentration von o-Dianisidin und von Hydroperoxyd nicht besser gewählt werden konnte, daß aber eine geringgradig höhere Hämoglobinkonzentration im Gel - 1,0 ml anstatt 0,7 ml der 5 %igen Lösung auf 450 ml Gel - wiederum schärfere Banden ergibt.

Bezüglich der Empfindlichkeit des Verfahrens ist festzustellen, daß die Katalase noch in Hämolysaten mit einer Hämoglobinkonzentration von 0,1 g% gut nachweisbar ist. Dies wurde an Hand von Verdünnungsreihen mit Konzentrationen von 10, 3,3, 1,0, 0,33 und 0,10 g% Hämoglobin ermittelt.

Der isoelektrische Punkt wurde für Hb A₁ bei pH 7,3 gefunden. Für die Katalase des Menschen lag er etwa bei pH 6,0, denn bei verschiedenen Läufen, z.B. solchen, bei denen im Gel und den Elektrodenschalen ein mit dem pH-Meter kontrollierter Borax-Phosphat-Puffer nach KOLTHOFF mit pH 6,0 verwendet wurde, blieb die helle Bande der Katalase genau an der Auftragsstelle liegen.

Im Laufe dieser Untersuchungen zeigte sich mehrfach die schon von anderer

Seite beschriebene relative Vermehrung der Katalase bei hypochromen Anämien.

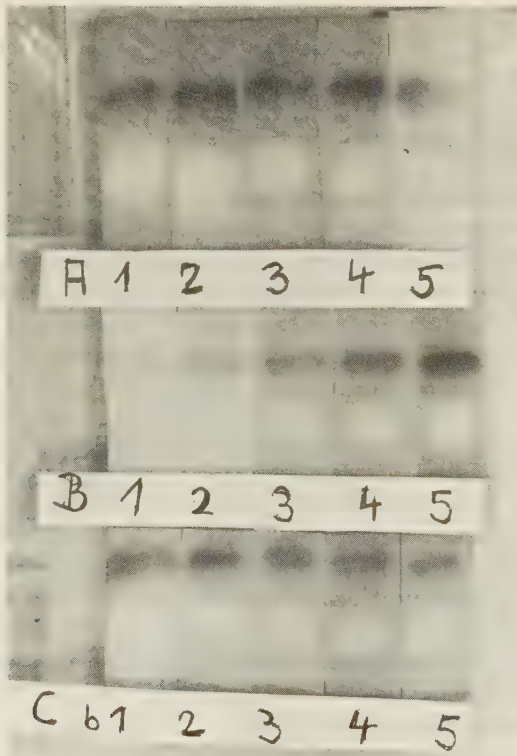


Abbildung 1: Untersuchungen zur Methode.

A: verschiedene H_2O_2 -Konzentration bei der Färbung: Bei 1 0,01 ml, bei 2 0,02 ml, bei 3 0,05 ml, bei 4 0,1 ml und bei 5 0,3 ml H_2O_2 auf 60 ml Färbelösung.

B: Verschiedene Dianisidin-Konzentration bei der Färbung: Bei 1 2 mg, bei 2 5 mg, bei 3 10 mg, bei 4 20 mg und bei 5 50 mg auf 60 ml Färbelösung.

C: Verschiedene Hämolyssatzkonzentrationen im Gel: Bei 1 0,025 ml, bei 2 0,05 ml, bei 3 0,1 ml, bei 4 0,2 ml und bei 5 0,4 ml Hämolyssat auf 90 ml Gel.

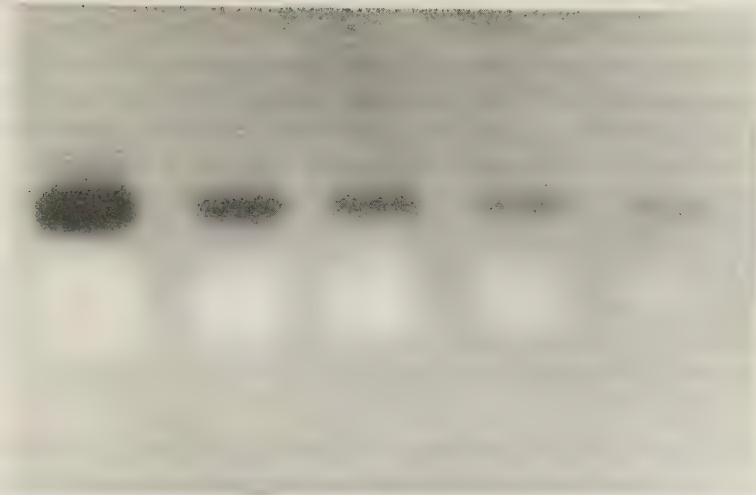


Abbildung 2: Verschiedene Konzentration des aufgetragenen Hämolsates; von links: 10, 3, 3, 1, 0, 0,33 und 0,10 g% Hämoglobin.

2. Alterung in Vitro

Bei der Alterung von Hämolsaten wurden zwei Versuchsreihen angesetzt, eine für die Alterung im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$, die andere für die Alterung in der Kühltruhe bei -18°C . Bei letzterer wurde das Hämolsat für die einzelnen späteren Läufe im kleinen Polyäthylenröhrchen eingefroren. Zu jeder Reihe gehörten fünf verschiedene Hämolsate mit einer Hämoglobin-Konzentration von 2 g%, die sich durch die Art ihres Hämoglobinanteiles unterschieden; und zwar oxy-Hämoglobin (ohne Zusatz), met-Hämoglobin (zu 10 ml Hämolsat 0,25 ml 0,1 %iges K_3FeCN_6), cyanmet-Hämoglobin (zu 10 ml Hämolsat 0,25 ml 0,1 %iges K_3FeCN_6 und 0,25 ml 0,1 %iges KCN), CO-Hämoglobin (Hämolsat wird mit Leuchtgas durchperlt) und Hämoglobin+KCN (zu 10 ml Hämolsat 0,35 ml 0,1 %iges KCN). Es wurde zu Anfang eine Elektrolyse durchgeführt und weiter in wöchentlichen Abständen.

Am schlechtesten bei Kühlschranktemperatur hält sich die Katalase im unveränderten Hämolsat mit oxy-Hämoglobin, sie läßt sich dort schon nach drei

Wochen nicht mehr nachweisen. Es folgen die Hämolysate mit CO-Hämoglobin und mit Zugabe von KCN, während die mit met-Hämoglobin und mit cyanmet-Hämoglobin teilweise bis zur dreizehnten Woche nachweisbar bleiben. Die Nachweisbarkeit der Hämoglobine verhielt sich davon völlig unabhängig; zu bemerken war nur, daß das met-Hämoglobin immer etwas langsamer als die anderen Hämoglobine lief. Bei allen Läufen dieser Reihe zeigten die Katalasen eine höhere relative Wanderungsgeschwindigkeit (siehe Abschnitt C. 5), als in frischen Hämolysaten, sie lag hier zwischen 0,70 und 0,78.

Bei Kühltruhentemperaturen liegen die Verhältnisse ganz anders. Hier denaturiert die Katalase im Hämolysat mit KCN schon nach vier Wochen völlig. In den vier anderen Hämolysaten hielt sich die Katalase mehr als drei Monate gut, am besten bei CO-Hämoglobin und oxy-Hämoglobin. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Katalase hat sich ebenso wenig geändert wie die der Hämoglobine. Das met-Hämoglobin wandert auch hier wieder etwas langsamer als die anderen Hämoglobine.

Als Folgerung dieser Ergebnisse scheint der Vorschlag berechtigt, katalasehaltige Substrate sofort zu verarbeiten, oder unter Zugabe von rotem Blutlaugensalz im Kühlschrank bei 4° C aufzubewahren oder ohne Zusatz einzufrieren.

Darüber hinaus findet aber noch die Feststellung Beachtung, daß sich die Katalase in Vollblutkonserven im Gegensatz zu der in Hämolysaten offensichtlich über Monate hinaus kaum verändert.

3. Alterung in Vivo

Um die von THORUP, CARPENTER und HOWARD (49) angegebene verschiedene elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit für Katalase aus alten und jungen Erythrozyten zu untersuchen, benutzten wir das bekanntlich sehr retikulozytenreiche Nabelschnurblut eines gesunden Neugeborenen. Das Blut wurde außer der sonstigen Behandlung vor der Hämolyse für 30 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Nach Entfernung der Leukozytenschicht wurden von dem oben in Zentrifugengläschen liegenden retikulozytenreichen und dem unten liegenden retikulozytenarmen Erythrozytenbrei je ein Ausstrich und ein Hämolysat gemacht. Nach den Untersuchungen von BORUN et al. gelangen die jüngeren Zellen auf Grund ihres höheren Lipoid-Gehaltes an die Oberfläche des Röhrchens. In der Elektrophorese sah man dann, daß die Katalase des jungen (200⁰/oo Retikulozyten) Blutes etwas langsamer läuft (relative Wanderungsgeschwindigkeit = 0,57) als das ältere (10⁰/oo Retikulozyten) Blut (relative Wanderungsgeschwindigkeit = 0,63).

Eine weitere Möglichkeit, die in-vivo-Alterung der Katalase zu überprüfen, liegt in der Anwendung der osmotischen Hämolyse nach SIMON und TOPPER (36). Hierbei wird Blut mit Kochsalzlösung absteigender Konzentration (0,41 - 0,37 %ig) gemischt, dadurch zum Teil hämolysiert, zentrifugiert der jeweilige Überstand abpipettiert und auf gleiche Konzentration gebracht. Da alte Erythrozyten empfindlicher sind als junge, kann man die Veränderungen der Katalase in Abhängigkeit von der Alterung der Erythrozyten verfolgen. Es zeigte sich, daß mit steigendem Alter die Katalase schneller läuft; mit anderen Worten: Im ersten Hämolysat mit 0,41 %iger NaCl-Lösung (alte Erythrozyten) hatte die Katalase eine relative Wanderungsgeschwindigkeit von 0,75, im letzten mit 0,37 %iger NaCl-Lösung (junge Erythrozyten) eine solche von 0,60. Diese Ergebnisse der in-vivo-Alterung entsprechen also durchaus den eben berichteten der in-vitro-Alterung.

4. Hitzedenaturierung

Zur Feststellung der Hitzestabilität der Katalase wird eine Reihe Reagensgläser mit Hämolysaten einer 3 %igen Hämoglobin-Konzentration 10 min im Wasserbad auf je 40, 50, 60, 70 und 80° C erwärmt, wonach die Hämolysate elektrophoretisch getrennt werden. Danach erwies sich, daß die Phase der Hitzedenaturierung der Katalase zwischen 60 und 70° C, die von Hämoglobin zwischen 70 und 80° C liegt. Interessant ist noch festzustellen, daß die Temperatur von 60° C am Katalasemolekül doch schon solche Veränderungen setzt, daß sie von ihrer normalen relativen Wanderungsgeschwindigkeit von 0,65 auf eine solche von 0,55 sinkt, d.h. also, daß sie langsamer wandert.

5. Katalase bei verschiedenen Hämoglobinen

Die an das Hämatologische Labor der Universitäts-Kinderklinik Tübingen eingesandten Blutproben mit pathologischen Hämoglobinen wurden im Rahmen dieser Arbeit auf die elektrophoretischen Eigenschaften der Erythrozytenkatalase hin untersucht. Es zeigte sich allerdings, daß bei allen untersuchten Hämoglobinen, sowohl bei den physiologisch vorkommenden Hb A₁, Hb A₂ und Hb F, als auch bei den pathologischerweise vorkommenden Hb F (bei Thalassämia major), Hb S, Hb C und Hb H die Katalase immer gleich schnell in die gleiche Richtung wandert, wie in Hämolysaten von gesunden Versuchspersonen.

Um diese Befunde vergleichen zu können, wurden zwei Vergleichsgrößen eingeführt, die relative Wanderungsgeschwindigkeit der Hämoglobine und die relative Wanderungsgeschwindigkeit der Katalasen. Der Wert für die relative Wanderungsgeschwindigkeit der Hämoglobine gibt an, wie weit die verschiedenen menschlichen und tierischen Hämoglobine im Vergleich zum menschlichen Hämoglobin A₁ wandern und wird wie folgt errechnet:

$$\text{Rel. Wanderungsgeschw.d.Hb} = \frac{\text{Strecke des betreffenden Hämoglobins}}{\text{Strecke des menschlichen Hb A}_1}$$

Der Wert der relativen Wanderungsgeschwindigkeit für Hb A₁ beträgt demnach 1,0.

Die relative Wanderungsgeschwindigkeit der Katalasen ist eine entsprechende Vergleichszahl für die Katalasen:

$$\text{Rel. Wanderungsgeschw.d.Kat.} = \frac{\text{Strecke der betreffenden Katalase}}{\text{Strecke des menschlichen Hb A}_1}$$

Die relative Wanderungsgeschwindigkeit für die menschliche Erythrozytenkatalase ist 0,65.

Die einzelnen Wanderungsstrecken wurden von den Photographien abgelesen und in obige Formeln eingesetzt.

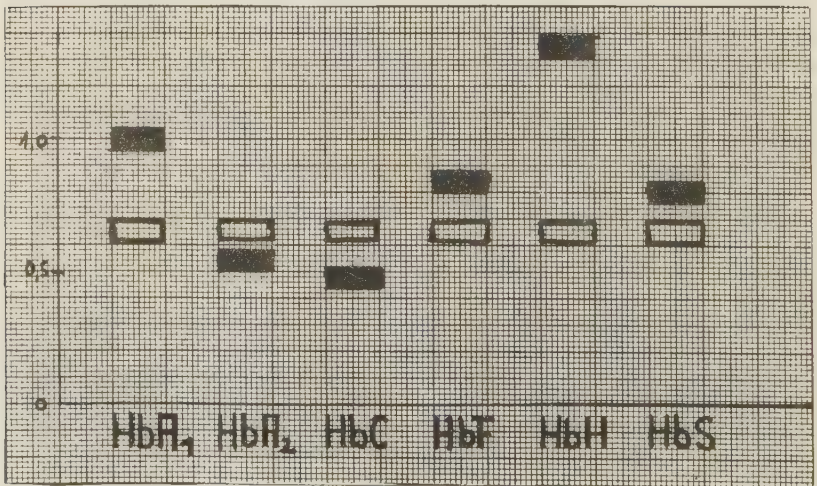


Abbildung 3: Relative Wanderungsgeschwindigkeit verschiedener menschlicher Hämoglobine. Da die Katalase bei diesen Hämolysaten immer gleich schnell

lief, entspricht die obige Abbildung einem gemeinsamen elektrophoretischen Lauf (siehe auch Abbildung 4).

Auch in einer Lösung von nach DRABKIN (16) kristallisiertem Hämoglobin A₁ ließ sich noch Katalase mit der normalen Wanderungsgeschwindigkeit nachweisen, während Lösungen mit von STÖFFLER et al. (39, 40) kristallisiertem Hämoglobin F keine Katalase mehr enthielten.

6. Anormale Katalase

In die eben geschilderten Untersuchungen der eingesandten Blutproben wurden 60 Blutproben von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen, davon 20 mit Thalassämien eingeschlossen. Hier fanden sich nun in zwei Fällen von Thalassämia minor (3,5 bzw. 4,5 % Hb A₂) eine schneller wandernde Katalase (relative Wanderungsgeschwindigkeit von 0,75 bzw. 0,84) als im normalen Hämolysat.

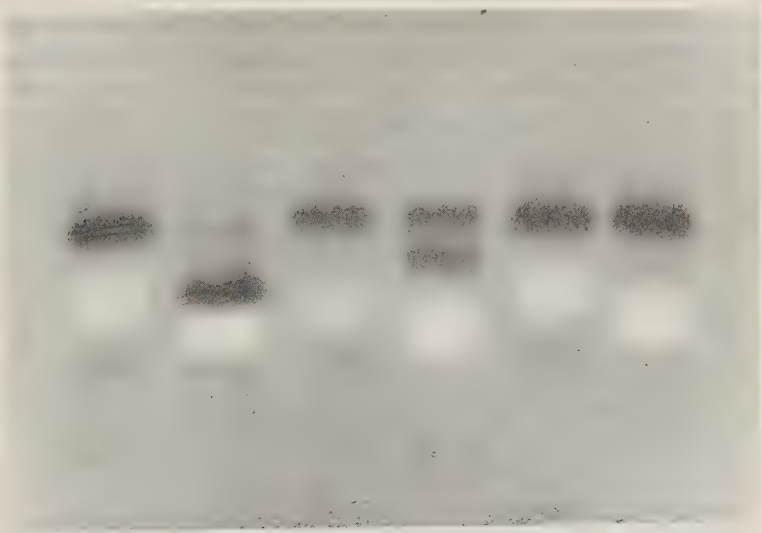


Abbildung 4: Anormale Katalase bei Thalassämia minor. Das erste, dritte und fünfte Hämolysat von links stammen von einem Patienten mit Thalassämia minor, das zweite von einem mit homozygoter Sichelzellanämie, das vierte von einem Neugeborenen und das sechste von einer gesunden Versuchsperson.

Bei Benutzung eines anderen Puffersystems und anderer Elektrophorese-Zeiten (Gelpuffer: Sørensen-Phosphat-Puffer, pH 6,8; Brückenpuffer: Tris-EDTA-Borat-Puffer, pH 9,0; Laufzeit 14 Stunden) zeigte die anormale Katalase eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode als die normale, während die Hämoglobine zur Kathode wanderten.

Bei den Hämolysaten von Patienten mit Thalassämia maior wurde eine solche Anormalität der Katalase nicht festgestellt.

7. Katalase bei Tieren

Es wurden Hämolysate von neunzehn erwachsenen Tieren und zwei verschiedenen Föten auf das Vorhandensein und die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der Katalase untersucht. Bei Enten, Fröschen, Hühnern, drei verschiedenen Hunderassen, Igel und Maulwürfen konnte in der Elektrophorese keine Katalase festgestellt werden, obwohl bei Zugabe von einem Tropfen Wasserstoffperoxyd zu einem Tropfen Hämolysat dieser Tiere eine mäßige Schaumentwicklung eintrat. Bemerkenswert war, daß bei allen anderen Tieren nur je eine Katalase auftrat, auch bei solchen mit mehreren Hämoglobinen. Bei Rindern und Schafen z.B., bei denen je zwei verschiedene Hämoglobine einzeln oder kombiniert vorkommen können, und bei den entsprechenden Föten läßt sich immer nur eine Katalase nachweisen.

Die Breite der Katalasebanden ist je nach der Konzentration des Enzyms ausgebildet. In der Abbildung ist sie der Übersichtlichkeit wegen immer gleich breit gezeichnet, ebenso die der Hämoglobine.

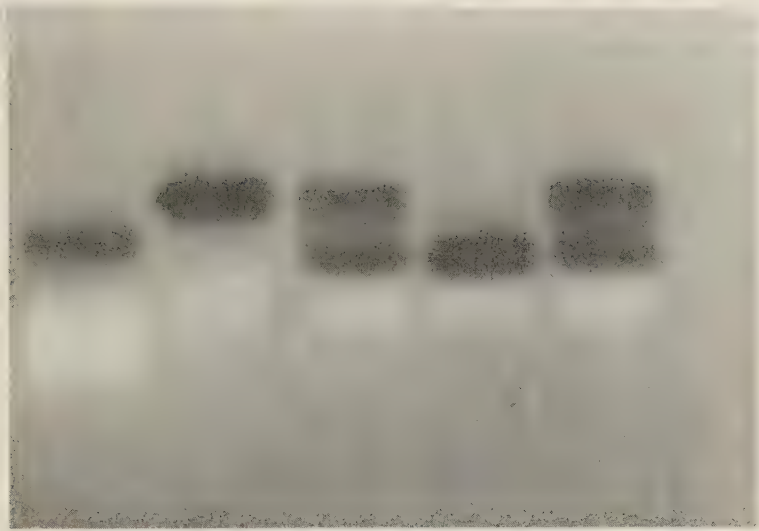


Abbildung 5: Katalase bei verschiedenen Hämoglobinen vom Schaf. Von links: Vergleichshämolysat vom Mensch, Hämolysat von einem Schaf mit Hb B, mit Hb A und Hb B, mit Hb A, und Mischung von einem Schaf mit Hb A und einem mit Hb B.

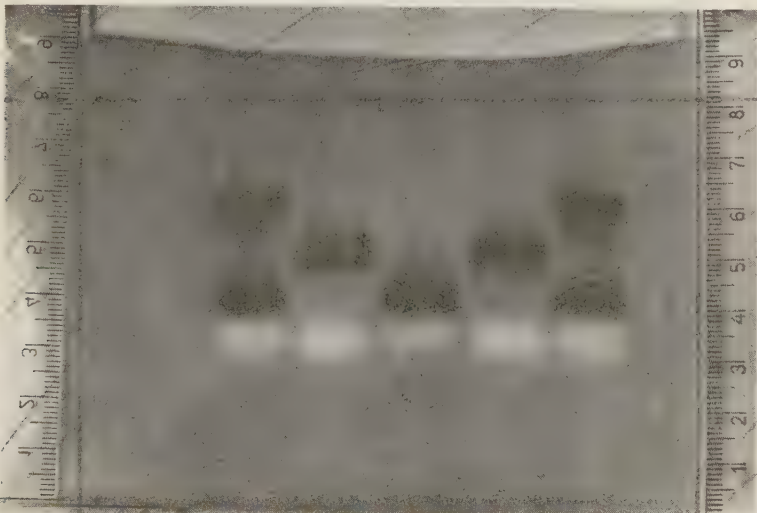


Abbildung 6: Katalase bei verschiedenen Hämoglobinen vom Rind.

Von links: Hämolysat von einem Rind mit Hb A und Hb B, von einem 8 cm langen Rinderföten mit Hb F, von einem Rind mit Hb A, von einem 8 cm langen Rinderföten und von einem mit Hb A und Hb B.

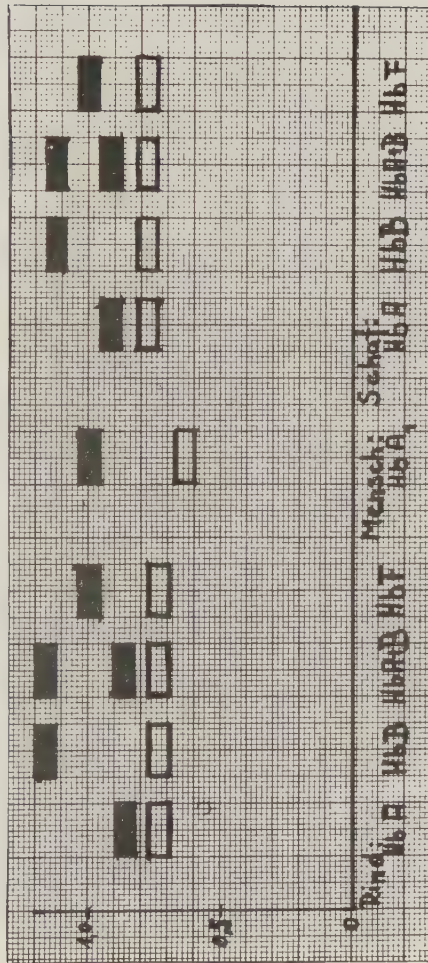


Abbildung 7: Relative Wanderungsgeschwindigkeiten von Hämoglobinen und Katalasen bei Rind und Schaf für alle vorkommenden Kombinationen. Zum Vergleich die entsprechenden Werte für den Menschen in der Mitte.

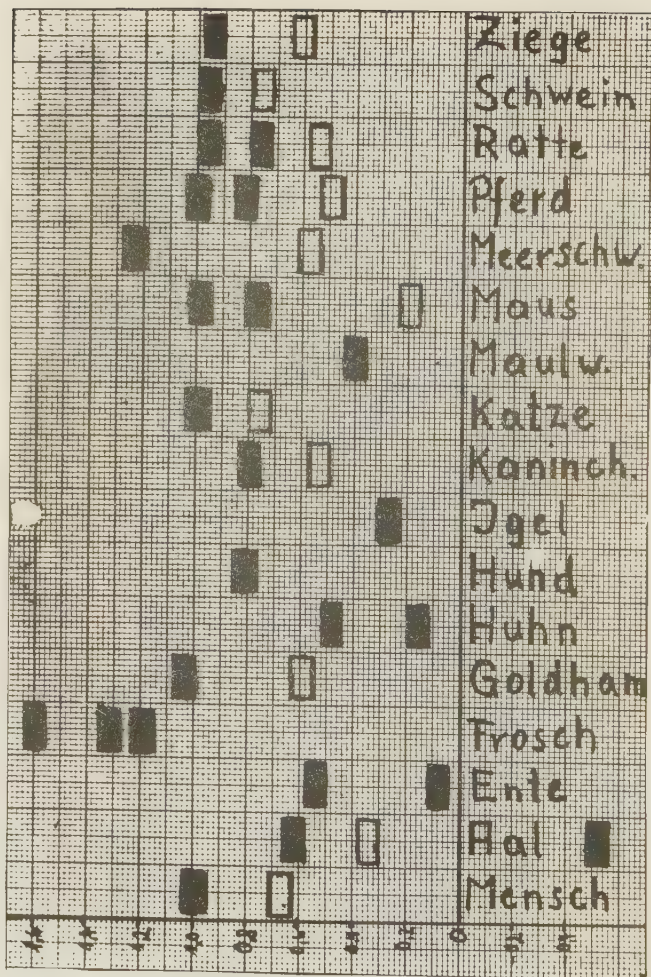


Abbildung 8: Relative Wanderungsgeschwindigkeiten von Hämoglobinen und Karatzen bei allen untersuchten Tieren und vom Menschen. Die entsprechenden Werte für Rinder und Schafe siehe Abb. 8.

8. Quantitative Katalasebestimmung

Mit der Methode von FEINSTEIN (18) und ihrer nach MARTI (31) modifizierten Form wurden quantitative Bestimmungen der Erythrozyten-Katalase an Menschen- und zwölf Tier-Hämolysaten (Ente, Frosch, Hund, Igel, Katze, Maus, Pferd, Ratte, Rind, Schaf, Schwein und Ziege) unternommen. Hierbei zeigte sich, daß nur in Enten- und mit Natriumacid versetzten Hämolysaten keine Katalase nachweisbar war. Bei allen anderen untersuchten Tieren lag die Katalase-Konzentration in der Größenordnung derjenigen des Menschen. Mit 0,2 ml einer 0,1 %igen KCN-Lösung konnte noch keine Inaktivierung der Katalase erreicht werden.

D. DISKUSSION

Die von KLEIHAUER und BRANDT (25) zur elektrophoretischen Bestimmung der Erythrozytenkatalase angegebene Methode hat sich in diesen Untersuchungen als einfach durchführbar und empfindlich bewährt. An Einfachheit übertrifft sie die verschiedenen elektrophoretischen und die meisten anderen Verfahren, die mit ihr zu vergleichen sind (6, 12, 48, 50). Die Empfindlichkeit liegt etwa in der Größenordnung der durch die Verfahren von BLUMBERG und MARTI (12) (entsprechend etwa einer Hämoglobin-Konzentration von 0,04 g%) und von THORUP, STROLE und LEAVELL (48) (entsprechend einer Hämoglobin-Konzentration von 0,078 g%) zu erreichenden; d.h. sie ist geeignet, auch noch die Restaktivität der Katalase bei Akatalasien nachzuweisen, die bei 0,1 - 1,3 % der normalen Aktivität liegt (1, 2). Leider haben BAUR (6) und auch TUDHOPE (50) keine Angaben darüber gemacht, wie empfindlich ihre Methoden sind.

In Übereinstimmung mit THORUPE, CARPENTER und HOWARD (49), aber im Gegensatz zu BLUMBERG und MARTI (12), die allerdings ein anderes Verfahren benutzten, konnten wir feststellen, daß in dem benutzten pH-Bereich die Katalase von gealterten Hämolysaten schneller in der Elektrophorese wandert, als die von frischen Hämolysaten. Das ist umso auffälliger, als dies Verhalten z.B. bei den mituntersuchten Hämoglobinen nie der Fall war. Die Ursache hierfür ist auch noch gar nicht geklärt, jedoch spielt gewiß das Milieu im Hämolysat eine wichtige Rolle, denn bei der Kühlschrankreihe war in dem Hämolysat ohne Zusatz nach drei Wochen keine Katalase mehr nachweisbar, während sie in anderen, z.B. in denen mit rotem Blutlaugensalz versetzten, länger als drei Monate beobachtet werden konnte. Auch von der Temperatur ist dieses Phänomen abhängig, denn bei Kühltruhtemperatur (-18°C) traten solche Veränderungen nicht auf. Damit stimmt die Beobachtung überein, daß die Katalase in vivo auch einem Alterungsprozeß unterliegt, der dem der In-vitro-Alterung entspricht, wie das auch von THORUP, CARPENTER und HOWARD (49) gefunden wurde. Diese Autoren nehmen nach ihren säulenchromatografischen Untersuchungen einen fortschreitenden Umbau der molekularen Struktur der Katalase an.

Über die Beständigkeit der Katalase gegenüber Wärmeeinwirkung konnte keine Bemerkung in der Literatur gefunden werden. Daher ist der Wert, nach dem die

Katalase bei Temperaturen um 60° C denaturiert wird, auch nicht zu vergleichen.

Bei der Untersuchung der Erythrozyten-Katalase von gesunden und kranken Menschen mit verschiedenen Hämoglobinen (A₁, A₂, C, F, H, S) stellte sich, wie schon BLUMBERG und MARTI (12) für Hb C, E, S, Lepore und Zürich angaben, heraus, daß immer nur ein und dieselbe Katalase mit der gleichen Wanderungsgeschwindigkeit zu identifizieren war. Dies gilt auch für verschiedene andere hämatologische Erkrankungen, einige chromosomale Anomalien (z.B. Turner -Syndrom und Mongolismus) und Neugeborene. Es bestehen also offensichtlich keine Beziehungen zwischen Hämoglobin- und Katalasebildung, denn sogar von Eisenmangelzuständen bleibt der Katalasegehalt ziemlich unberührt. Die von THORUP, STROLE und LEAVELL (48) gefundenen Abweichungen von der normalen Wanderungsgeschwindigkeit der Katalase bei anormalen Hämoglobinen konnten wir somit nicht bestätigen.

Als Ausnahme fanden sich in den mit Sicherheit nicht gealterten Hämolysaten von zwei Patienten mit heterocygoter β -Thalassämie, einem Italiener und einem Deutschen, schneller wandernde Katalasen der Erythrozyten, bei dem Italiener mit einer relativen Wanderungsgeschwindigkeit von 0,75, bei dem Deutschen mit einer solchen von 0,84. Da noch etliche andere Thalassämie-Patienten aus verschiedenen Ländern untersucht wurden und sich dabei keine anormale Katalase fand, ist ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung und dem atypischen Befund als fraglich anzusehen. Ebenfalls eine Katalase mit anormaler Wanderungsgeschwindigkeit, hier aber eine langsamere, fand BAUR (5) bei sechs sonst gesunden Mitgliedern einer kaukasischen Familie. Beziehungen zu unseren Fällen mit anormaler Katalase bestehen offensichtlich nicht.

Ähnliche Ergebnisse wie für die Katalase bei menschlichen Hämoglobinen konnten bei allen untersuchten Tieren erhoben werden. Am besten sind sie bei Rindern und Schafen klar zu machen. Diese Tiere haben entweder eine langsam wandernde Hämoglobinfraction Hb A, oder eine schnelle Fraction Hb B, oder die Kombination Hb A + Hb B oder ein fötales Hb F (bei Rindern wurden Föten herunter bis zu 5 cm und bei Schafen bis zu 7 cm Länge untersucht). In den jeweils vier Fällen (Hb A, Hb B, Hb A+Hb B, und Hb F) läßt sich immer nur die gleiche Katalase nachweisen. Gleiches gilt auch von menschlichem Nabelschnurblut, so daß sich für die Annahme einer fötalen Katalase in Anlehnung etwa an das fötale Hämoglobin und das fötale Myoglobin kein Anhalt findet. Aber auch bei allen anderen Tieren, von denen teilweise bis zu dreißig Exemplare untersucht wurden, konnten bei verschiedenen (Rind, Schaf, Maus) und mehreren (Aal, Pferd, Ratte) Hämoglobinen jeweils nur eine Katalase gefunden werden.

Unklar ist noch der Befund, warum bei Anwendung des hier benutzten Verfahrens bei einigen Tieren sich keine Katalase feststellen ließ, obwohl deren Hämolysate nach Zugabe von H_2O_2 Schaum entwickelten und obwohl in den quantitativen Verfahren die Katalase nachweisbar war.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der von KLEIHAUER und BRANDT angegebenen Methode zur stärkegel-elektrophoretischen Bestimmung der Erythrozytenkatalase wurde festgestellt:

1. daß die menschliche Erythrozyten-Katalase nach der In-vitro - ebenso wie nach der In-vivo-Alterung der Erythrozyten in der Elektrophorese schneller läuft,
2. daß die Grenze der Hirzestabilität bei etwa 60° C liegt,
3. daß die relative Wanderungsgeschwindigkeit der menschlichen Erythrozyten-katalase aus Hämolysaten mit verschiedenen normalen und pathologischen Hämoglobinen immer die gleiche ist,
4. daß bei den verschiedensten Tieren und ihren Föten, auch wenn sie mehrere Hämoglobine haben, die Erythrozytenkatalase die jeweils gleiche relative Wanderungsgeschwindigkeit hat,
5. daß bei Eisenmangelanämien der Katalasegehalt der Erythrozyten kaum verändert ist,
6. daß als Folgerung aus diesen Beobachtungen zu sagen ist, daß der Katalase-stoffwechsel ziemlich unabhängig von dem der anderen Häm-Proteide abläuft,
7. daß in seltenen Fällen, hier bei zwei Patienten mit Talassämia minor, eine anormale Wanderungsgeschwindigkeit der Erythrozytenkatalase auftreten kann.

F. LITERATUR

1. AEBI, H., M. BAGGIOLINI, BEATRICE DEWALD, E. LAUBER, HEDI SUTER, A. MICHELI und J. FREI: Observation in two Swiss Families with Acatalsia II. *Enzymol.biol.clin.*, 4, 121 (1964)
2. AEBI, H., J.P. HEININGER, R. BÜTLER und A. HÄSSIG: Two cases of acatalasia in Switzerland. *Experientia* 17, 466 (1961)
3. AEBI, H., C.H. SCHNEIDER, H. GANG und U. WIESMANN: Separation of catalase and other red cell enzymes from hemoglobin by gel-filtration. *Experientia* 20, 103 (1964)
4. AGNER, K., *Biochem.J.* 32, 1702 (1938)
5. BAUR, E.W.: Catalase abnormality in a caucasian family in the United States. *Science*, 140, 816 (1963)
6. BAUR, E.W.: Electrophoresis of serum haptoglobins and erythrocyte catalase using capillary blood. *Clin.Chem.Acta*, 9, 252 (1964)
7. BEERS, R.F. jr., and I.W. SIZER: A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J.Biol.Chem.*, 195, 133 (1952)
8. BERGMAYER, H.U.: Zur Messung von Katalase-Aktivitäten. *Biochem.Z.*, 327, 255 (1955)
9. BETKE, K. und E. GRÖSCHNER: Das Verhalten der Katalase in den Erythrozyten hypochrom-anämischer Säuglinge und Kleinkinder. *Klin.Wschr.*, 535 (1959)
10. BETKE, K. und W. SAVELSBURG: Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels Cyanhämoglobin. *Biochem.Z.*, 320, 431 (1950)
11. BINGOLD, K.: Über die Bedeutung von Katalase und Hydroperoxyd für den Blutfarbstoffwechsel. Darstellung eines biologischen Blutfarbstoffabbaues auf Grund von Modellversuchen. *Dtsch.Arch.klin.Med.*, 177, 230 (1935)

12. BLUMBERG, A. und H.R. MARTI: Untersuchungen der Erythrozytenkatalase mittels Stärkeblockelektrophorese. Klin. Wschr. 842 (1962)
13. BONNICHSEN, R.K., B. CHANCE, H. THEORELL: Catalase activity. Acta chem.scand., 1, 685 (1947)
14. CHANCE, B.: The reaction of catalase and cyanide. J.Biol.Chem., 179, 1299 (1949)
15. CHANCE, B. und A.C. MEALILY, in: Methods in Enzymology (S.P.Colowick and N.O. Kaplan, Eds.), II Bd., Academic Press Inc., New York (1955)
16. DRABKIN, D.L., Arch.Biochem., 21, 224 (1949)
17. EULER, H.v. und K. JOSEPHSON: Über Katalase. I. Liebigs Ann. Chem. 452, 158 (1927)
18. FEINSTEIN, R.N.: Perborate as a substrate on a new assay of catalase. J.biol.chem., 180, 1197 (1949)
19. GOLDBLITH, S.A. and B.E. PROCTOR: Photometric determination of catalase activity. J.Biol.Chem., 187, 705 (1950)
20. GRÖSCHNER, E.: Erythrozytenkatalase bei Frühgeborenen und reifen Säuglingen in der Neugeborenenperiode. Inaug.Diss. Freiburg 1960
21. HERBERT, D. und AUDREY J. PINSENT: Nature 160, 125 (1947)
22. JUSATZ, H.J.: Eine neue einfache Methode der quantitativen Bestimmung der Blutkatalase. Klin. Wschr., 1188 (1932 II)
23. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Stuttgart, 1961, Seite 149
24. KEILIN, D., und E.F. HARTREE: Biochem.J., 39, 293 (1945)
25. KLEIHAUER, E. und G. BRANDT: Quantitative estimation of erythrocyte catalase by starch-gel electrophoresis. Nature (lond) 204, 478 (1964)
26. KÜNZER, W., E. SCHÜTZ und E. AMBS: Untersuchungen zur Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrozyten. III. Mitteilung. Zur Aktivität der Katalase im Neugeborenenblut. Z.Kinderheilk. 76, 48 (1955)
27. LEMBERG, R. und E.C. FOULKES: Reaction between catalase and hydrogen peroxide. Nature, 161, 131 (1948)
28. LEUTHARD, F.: Lehrbuch der Physiologischen Chemie. Berlin 1961, Seite 234, 235

29. LOEW, O. : Catalase, a new enzyme of general occurrence, with special reference to the tobacco plant. U.S.Dept.Agric. Report No 68, (1901)
30. LOEW, O. : Zur physiologischen Bedeutung der Katalase. Zentralbl. Bakteriologie, 21, 1 (1908)
31. MARTI, H.R. : Normale und anormale menschliche Hämoglobine. Aus: Pathologie und Klinik in Einzeldarstellungen, Heidelberg, 1963
32. OWEN, J.A., H.J. SILBERMAN und C. GOT: Nature, 182, 1373 (1958)
33. RAPOPORT, S.M. : Medizinische Biochemie. Berlin 1964, Seite 74, 225, 256, 604
34. RAUDNITZ, R.W. : Über sogenannte Fermentreaktionen der Milch. Zentralbl. Physiol., 12, 790 (1898)
35. SCHÖNBEIN, C.F. : Über die katalytische Wirksamkeit organischer Materien und deren Verbreitung in der Pflanzen- und Tierwelt. J.prakt.Chem., 89, 323 (1863)
36. SIMON, E.R., Y.J. TOPPER: Fractionation of Human Erythrocytes on the Basis of their Age. Nature 180, 1211 (1957)
37. SMITHES, O. : Starch-gel electrophoresis. Metabolism, 13, 974 (1964)
38. STERN, K.G. : The constitution of the prosthetic group of catalase. J.Biol.Chem., 112, 661 (1936)
39. STÖFFLER, G., L. FLOHÉ, und F.W. TISCHENDORF: Large-scale Crystallization of Purified Human Foetal Oxyhaemoglobin from Cord Blood. Nature, Vol. 211, 768 (1966)
40. STÖFFLER, G., L. FLOHÉ und F.W. TISCHENDORF: Eigenschaften von reinem kristallinem Hb F. Blut, im Druck
41. SUMNER, J.B. and A.J. DOUNCE, Crystalline catalase. Science 85, 366 (1937)
42. TAKAHARA, S. and MIYAMOTO: Three cases of progressive oral gangrene due to lack of catalase in the blood. (Japanisch) J. otorhinolaryngol. Soc.Japan 51, 163 (1948)
43. TAKAHARA, S. : Progressive oral gangrene, probably due to lack of catalase in the blood (acatalasaemia). Report of nine cases. Lancet, 2, 1101 (1952)
44. THENARD, L.J. : Observations sur l'influence de l'eau dans la formation des acides oxigénés. Ann.chim.phys. 9, 314 (1818)

45. THEORELL, H.: Über die Wirkungsweisen der Katalasen. *Experientia*, 4, 100 (1948)
46. THIENEN, G.J. van: Über die perniziöse Anämie als eine selbständige Krankheit. Beitrag zu ihrer Symptomatiologie. *Dt. Arch. klin. Med.*, 131, 113 (1920)
47. THORUP, O.A. jr., W.E. STROLE and B.S. LEAVELL: The identification and rate of migration of erythrocyte catalase on starch-gel electrophoreses. *Proc. 7th int. Congr. Haemat.*, Rome, 1958, p.298. Grune u. Stratton, New York 1960
48. THORUP, O.A. jr., W.E. STROLE and B.S. LEAVELL: A method for the localisation of catalase on starch-gels. *J. Lab. clin. Med.*, 58, 122 (1961)
49. THORUP, O.A. jr., J.T. CARPENTER and P. HOWARD: Human erythrocyte catalase. Demonstration of heterogeneity and relationship to erythrocyte ageing in vivo. *Brit. J. Haemat.*, 10, 542 (1964)
50. TUDHOPE, G.R.: Detection of catalase after electrophoresis of haemolysates on starch gel. *Nature (Lond)*, 205, 404 (1965)
51. ZEILE, K. und HELLSTRÖM: Über die aktive Gruppe der Leberkatalase. *Z. physiol. Chem.*, 192, 171 (1930)
52. ZEILE, K.: Über die aktive Gruppe der Katalase. II. *Z. physiol. Chem.*, 195, 39 (1931)

Herrn Professor Dr. K. Betke danke ich sehr herzlich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Herrn Privatdozent Dr. E. Kleihauer danke ich ganz besonders für die großzügige Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Hämatologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik und für seine guten Ratschläge bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Für die Bereitstellung der Blutproben danke ich Herrn Privatdozent Dr. E. Kleihauer, der Universitäts-Kinderklinik (Direktor: Professor Dr. K. Betke) dem Pharmakologischen Institut (Direktor: Professor Dr. F. Lembeck), dem Physiologischen Institut (Direktor: Professor Dr. K. Brecht), dem Hygiene-Institut (Direktor: Professor Dr. R. -E. Bader) und dem Schlachthof Tübingen.

Lebenslauf

Am 9. Dezember 1940 wurde ich, Friedrich Kötz, in Daaden/Sieg als Sohn des Pfarrers Werner Kötz und seiner Frau Ruth, geb. Uhr, geboren. Von 1947 bis 1951 besuchte ich in Essen die Ev. Volksschule Berlinerstraße und von 1951 bis 1954 die Alfred-Krupp-Oberschule; von 1954 bis zum Abitur am 1. März 1960 war ich auf dem mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Städtischen Gymnasiums in Siegen.

Mit dem Sommersemester 1960 begann ich das Medizinstudium in Marburg; dort legte ich am 29. April 1961 die naturwissenschaftliche und am 29. Oktober 1962 die ärztliche Vorprüfung ab. Zu Beginn des klinischen Studiums wechselte ich auf die Universität Tübingen über, setzte dann das Studium zwei Semester an der Universität Hamburg fort und bestand am 11. August 1966 an der Universität Tübingen das Medizinische Staatsexamen.

